



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer: 0 322 712
A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 88121299.7

(51) Int. Cl.4: A61K 39/015 , C12N 15/00 ,
C12P 21/02 , A61K 39/395 ,
C12Q 1/68 , G01N 33/569

(22) Anmeldetag: 20.12.88

Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten:
ES + GR.

(30) Priorität: 30.12.87 DE 3744495
15.09.88 DE 3831351

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
05.07.89 Patentblatt 89/27

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: BEHRINGWERKE
Aktiengesellschaft
Postfach 1140
D-3550 Marburg 1(DE)

(72) Erfinder: Knapp, Bernhard, Dr.
Baumgarten 9
D-3550 Marburg-Schröck(DE)
Erfinder: Hundt, Erika, Dr.
Zum Hirtzborn 8
D-3550 Marburg-Wehrshausen(DE)
Erfinder: Enders, Burkhard, Dr.
Oberer Eichweg 12
D-3550 Marburg(DE)
Erfinder: Küpper, Hans, Dr.
Biegenstrasse 39
D-3550 Marburg(DE)

(74) Vertreter: Meyer-Dulheuer, Karl-Hermann, Dr.
et al
HOECHST Aktiengesellschaft Zentrale
Patentabteilung Postfach 80 03 20
D-6230 Frankfurt/Main 80(DE)

(54) Malaria-spezifische DNA-Sequenzen, ihre Expressionsprodukte und deren Verwendung.

(57) Die Erfindung betrifft malaria-spezifische DNA-Sequenzen, ihre Expressionsprodukte und deren Verwendung.
Eine Kombination von drei der Expressionsproteine, deren DNA-Sequenzen durch Screening einer lambda
gt11-Genbank mit einem monospezifischen Antiserum gegen die protektive 41 kD-Antigenbande aus P.falciparum
isoliert wurden, schützen in Modellversuchen Aotusaffen vollständig vor einer P.falciparum-Infektion.

EP 0 322 712 A2

Malaria-spezifische DNA-Sequenzen, ihre Expressionsprodukte und deren Verwendung

Ein wichtiger Schritt zur Entwicklung einer Vaccine gegen Malaria ist die Identifizierung protektiver Antigene. Als protektiv werden im allgemeinen solche Antigene eingestuft, die bei in vivo Versuchen im Tiermodell wie z.B. in Saimiri- oder Aotus-Affen einem Schutz vor einer intravenös gesetzten P.falciparum-Infektion ergeben haben. Bisher sind nur unbefriedigende Schutzversuche am Menschen beschrieben

5 worden, aber mehrere isolierte P.falciparum Proteine haben eine komplett oder teilweise Schutzwirkung im Tiermodell gezeigt. Dies trifft sowohl für elektrophoretisch gereinigte Proteinfraktionen von 75kD und 100kD zu als auch für die elektrophoretisch gereinigten Proteinbanden der Molekulargewichte 200kD, 140kD und 41kD (L.H. Perrin et al. (1984), Clin.exp.Immunol. 56, 67-72; L.H. Perrin et al. (1985) J.Clin.Invest. 75, 1718-1721; W.A. Siddiqui et al. (1987), Proc.Natl. Acad.Sci., USA 84, 3014-3018). Von den 10 bisher biotechnologisch hergestellten für Merozoiten spezifischen Proteinen zeigten ein rekombinanter Expressionsprotein der "5' repeat Region" des sog. RESA 155kD Merozoitenproteins als auch ein synthetisches Oligopeptid des 200kD Merozoitoberflächen-Vorläuferproteins sowie eine Kombination synthetischer Oligopeptide von Proteinen der Molekulargewichte 35kD, 55kD und 200kD in Immunisierungsversuchen mit Saimiri- oder Aotusaffen eine partielle Schutzwirkung. Gentechnologisch hergestellte rekombinante Proteine der obigen Antigene, welche eine Schutzwirkung in in vivo Experimenten mit Affen zeigen, sind potentielle Kandidaten für eine Malaria-Vaccine.

Ziel der Arbeiten war es, codierende Sequenzen für die von L. Perrin (1985 a.a.O) beschriebene protektive 41kD-Antigenbande zu isolieren, die Sequenzen zur Expression zu bringen und die Expressionsprodukte auf ihre protektive Wirkung hin im Affenmodell zu testen. Mit Hilfe eines spezifischen Antiserums 20 gegen die 41 kD-Antigenbande wurden aus einer genomischen Expressionsbank fünfzehn Klone isoliert und die Struktur ihrer Insertionen aufgeklärt. Die Sequenzen der Klone 41-1 bis 41-10 und 41-12 bis 41-15, sowie 41-17 sind in Tab. 1-15 dargestellt. Mit Hilfe zweier immunologisch sehr intensiv reagierender Klone (41-2 und 41-7) wurden aus dem zum Screening verwendeten Serum monospezifische Antikörper isoliert. Diese Antikörper reagieren im Western Blot spezifisch mit einem Merozoiten-Antigen von 41 kD.

25 Mit der Insert DNA des Klons 41-2 hybridisierte im Southern Blot ein 3,0 kb EcoRI-Fragment und ein 2,0 kb Sau3A-Fragment. Beide DNA-Fragmente wurden isoliert und sequenziert.

Das Sau3A-Fragment enthält die vollständige codierende Region des 41-2 Gens. Diese enthält keine Introns und codiert für 184 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 21512 D. Das 41-2 Protein besitzt eine Signalsequenz und zwei weitere hydrophobe Abschnitte. Repetitive Sequenzanteile sind nicht vorhanden. Western Blot Analyse von Schizontproteinen mit Kaninchen-Antiseren, welche gegen ein Expressionsprodukt hergestellt wurden, das 70 % der codierenden Region beinhaltet, ergab eine Bande von 29 kD. Weiterhin konnte durch Northern Blot Analyse eine mRNA von 1.6 kb nachgewiesen werden.

Die Insert DNA des Klons 41-7 codiert dagegen für das 41kD Protein. Kaninchen-Antiseren, welche gegen ein Fusionsprotein von 41-7 hergestellt wurden, erkennen im Western Blot eindeutig eine 41kD Bande. Durch Screening einer genomischen lambda gt11 EcoRI" Genbank mit der Insert DNA des Klons 41-7 konnte ein Klon identifiziert werden, der ein malariaspezifisches Insert von 2.3kb enthält. Dieses wurde isoliert und sequenziert. Es enthält die gesamte codierende Region für ein 41kD Protein. Das Gen codiert keine Signalsequenz und enthält weder Introns noch repetitive Abschnitte. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des 41kD Proteins von P.falciparum ist hochhomolog (>60%) zu Aldolasen aus Muskel und Leber von Säugern und zur Aldolase von Trypanosoma brucei. Im Gegensatz zum Säugergenom konnte für P.falciparum nur ein Aldolasegen pro Genom durch Southern Blot Analysen festgestellt werden.

Die Klone 41-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 17 wurden aufgrund ihrer Kreuzreaktivitäten mit dem Antiserum gegen die 41kD Proteinbande detektiert. Sie sind zur Herstellung einer Vaccine geeignet. Die Insert-DNAs der Klone 41-1 bis 41-5, sowie 41-7, 41-10 und 41-14 wurden in dem Vektor pEX-31 zur Expression gebracht und die resultierenden Fusionsproteine wurden gereinigt. Eine Kombination einer immunologisch wirksamen Menge von drei Expressionsprodukten (41-1, 41-2, 41-3) schützt Aotusaffen vor einer P.falciparum Infektion.

Die Erfindung betrifft folglich

- a) die gereinigten und isolierten DNA-Sequenzen der Klone 41-1 bis 41-10, 41-12 bis 41-15 und 41-17 sowie 41-2gen und 41-7gen einschließlich ihrer Transkriptionsprodukte,
- b) diese Sequenzen ganz oder teilweise enthaltenden DNA-Strukturen und Vektoren,
- c) mit solcher DNA transformierte pro- oder eukaryotische Zellen,
- d) die von diesen Zellen auf Grund der Transformation exprimierten Polypeptide oder Teile davon,
- e) deren Aminosäuresequenzen,

- f) Antikörper gegen die Polypeptide unter (d) einschließlich ihrer Anwendung zur passiven Immunisierung, zur Diagnostik und zur Reinigung besagter Polypeptide,
- g) Impfstoffe gegen Malaria, die Aminosäuresequenzen von (e) alleine oder in Kombination enthalten,
- h) ein Verfahren zur gentechnischen Herstellung der unter (d) angeführten Polypeptide oder Teilen

5 davon,

- i) sowie Anwendung der besagten Aminosäuresequenzen zur Diagnostik.

Weitere Ausgestaltungen der Erfindung sind in den nachfolgenden Beispielen, Tabellen und den Patentansprüchen aufgeführt.

10

Beispiele

15 Beispiel 1:

Screening einer lambda gt11-Expressions-Bank mit dem monospezifischen anti-41kD Serum

20 10^6 PFU (plaque forming units) einer genomischen lambda gt11 Expressionsbank (hergestellt aus DNA des P.falciparum-Stammes T996) wurden mit einem Antiserum gegen die 41kD Antigenbande (L.H. Perrin et al. (1985) a.a.O.) aus dem P.falciparum-Stamm SGE2 nach bekannten Methoden (L.S. Ozaki (1986), J. Immun. Method. 89, 213-219; Promega Biotec (1986), Proto Blot Immunoscreening System, Technical Manual) gescreent. Als Detektionssystem diente dabei ein anti-Kaninchen-IgG / alkalische Phosphatase-Konjugat (Promega, Bestell- Nr. P 3731).

25 Durch das Screening der genomischen lambda gt11-Genbank mit dem Antiserum gegen die 41kD Proteinbande konnten zwei sehr intensiv reagierende Klone (41-2 und 41-7) sowie dreizehn weitere schwächer reagierende Klone (41-1, 41-3, 41-4, 41-5, 41-6, 41-8, 41-9, 41-10, 41-12, 41-13, 41-14, 41-15 und 41-17) und etwa 40 weitere sehr schwach reagierende Klone identifiziert werden. Die Insert-DNA's der 30 fünfzehn Klone, die 140bp bis 650bp betragen, wurden mit EcoRI herausgeschnitten und zur weiteren Charakterisierung in die EcoRI-Stelle des Vektors pUC8 kloniert.

Beispiel 2

35

Sequenzierung der Insert-Fragmente Klone 41-1 bis 41-10, 41-12 bis 41-15 und 41-17

40 Die Sequenzierung der Insert-DNAs erfolgte nach der Didesoxymethode mit Hilfe eines Primers und eines Reverse Primers direkt von den pUC8-Plasmiden (E.Y. Chen and P.H. Seeburg (1985), DNA 4, 165-170). Die Tabellen 1-15 zeigen die malaria-spezifischen DNA-Sequenzen und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Klone 41-1, 41-2, 41-3, 41-4, 41-5, 41-6, 41-7, 41-8, 41-9, 41-10, 41-12, 41-13, 41-14, 41-15 und 41-17 in den einzigen möglichen offenen Leserahmen. Innerhalb dieser 15 Sequenzabschnitte findet man keinerlei Überlappungen und Homologien. Mit Hilfe des UWGCG (University of Wisconsin, Genetic Computer Group)-Programms wurden diese 15 Sequenzen auf homologe Sequenzabschnitte innerhalb der EMBL-Datenbank untersucht. Keine dieser 15 Partialsequenzen oder größere homologe Abschnitte sind bisher beschrieben worden. Lediglich die Sequenz des Klons 41-10 besitzt von Nukleotid 1 bis 134 eine 74 %ige Homologie mit einer Teilsequenz von Nukleotid 2144 bis 2274 des 140kD Protein Gens, wie in der Anmeldung DE-P 37 41 057 vorgeschlagen. Die Sequenz des Klons 41-10 ist auch die einzige, welche für P.falciparum-Proteine typische repetitive Sequenzabschnitte beinhaltet. Die Aminosäuresequenz dieses Klons verfügt über drei Tetrapeptide der Sequenz Pro-Ser-Glu-Ser, wobei der zweite Serinrest des zweiten Repeats, verursacht durch eine G-A Transition, durch einen Asparagin-Rest ersetzt ist.

55 Weiterhin besitzt die Sequenz des Klons 41-7 von Nukleotid 50 bis 163 eine 56 %ige Homologie mit einer Aldolase mRNA von Nukleotid 218 bis 331 aus der Ratte (T. Mucai et al. (1986), J. Biol. Chem. 261, 3347-3354).

Beispiel 3

Nachweis des 41kD Antigens mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen die Expressionsklone 41-2 und
 5 41-7

Aus dem Antiserum gegen die 41kD Proteinbande wurden nach der Methode von L.S. Ozaki (1986, a.a.O.) Antikörper isoliert, die spezifisch gegen die Produkte der Expressionsklone 41-1, 41-2, 41-3, 41-7, 41-8 und lambda gt11 (Kontrolle) gerichtet sind.

10 Zur Gewinnung von Schizonten wurde P.falciparum in Humanerythrozyten kultiviert (W. Trager und J.B. Jensen (1976), Science 193, 673-675) und durch Behandlung mit Sorbit synchronisiert (C. Lambros und J.P. Vanderberg (1979), J.Parasitol. 65, 418-420). Eine Anreicherung der Schizonten auf ca. 90 % wurde durch Flotation in Gelafundin^(R) (Braun Melsungen) erzielt (analog G. Pasvol et al. (1978), Ann.Trop.Med.Parasitol. 72, 87-88). Die Schizonten wurden abzentrifugiert, gewaschen, 5 min. in SDS-Probenpuffer auf 100 °C erhitzt, mit Ultraschall behandelt und aliquotiert eingefroren.

15 Aliquots der Schizontenlösung wurden für die Western blot Analyse der oben erwähnten spezifischen Antikörper verwendet (D.A. Johnson et al. (1984) Gene Anal. Tech. 1, 3-8). Dabei reagierten die Antikörper, die mit Hilfe der Expressionsklone 41-2 und 41-7 isoliert wurden, sehr intensiv mit einer 41kD Antigenbande aus Schizonten.

20

Beispiel 4

25 Klonierung eines DNA-Fragmentes, das die genetische Information des Klons 41-2 beinhaltet

15 µg genomische DNA des P.falciparum-Stammes FCBR, die durch Lyse von Schizont-Kulturen mit anschließender Ethidiumbromid-CsCl-Zentrifugation gewonnen wurden (P. Oquendo et al. (1986) Molecular and Biochemical Parasitology 18, 89-101), wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut, nach der Vorschrift des Herstellers auf Gene Screen Membranen (Dupont) geblottet und anschließend mit nicktranslatierter Insert-DNA des Klons 41-2 mit einer spezifischen Aktivität von 10⁷ bis 10⁸ dpm/µg hybridisiert. Nach dem Waschen des Filters in 0,3xSSC (1xSSC: 0,15 M NaCl, 0,015 M NA-Citrat) und 1 % SDS (Natriumdodecylsulfat) bei 65 °C für 1 h wurden die Filter autoradiographiert. Mit Hilfe dieses Southern Blot Experimentes wurde ein ca. 3kb großes genomisches EcoRI Fragment identifiziert, das mit der Insert-DNA des Klons 41-2 hybridisiert. In einem präparativen Gel wurden 60 µg mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnittene P.falciparum DNA des Stammes FCBR aufgetrennt, die Region von 2,8kb bis 3,2kb wurde ausgeschnitten und elektroeluiert (B. Perbal (1984), A Practical Guide to Molecular Cloning). Diese DNA wurde nach der Methode von T.V. Huynh et al. (in DNA cloning Vol. I, ed. D.M. Glover (1985), 49-88) in den Vector lambda gt10 kloniert. 10⁵ PFU der erhaltenen Genbank wurden mit nicktranslatierter Insert-DNA des Klons 41-2 nach bekannten Methoden (T. Maniatis et al. (1982), Molecular Cloning, A Laboratory Manual) gescreent. Daraus resultierten mehrere Phagenklone, die mit der Insert-DNA des Klons 41-2 hybridisierten. Die Phagen DNA eines dieser Klone wurde isoliert (R.W. Davis et al. (1980), A Manual for Genetic Engineering, Advanced Bacterial Genetics), und mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut; ein 3,0kb großes DNA-Fragment wurde geelektrophoretisch gereinigt und in die EcoRI-Restriktionsstelle des Vektors pUC18 subkloniert (Plasmid pUC 41-2gen). In der anschließenden Southern-Blot Analyse (T. Maniatis et al., a.a.O.) hybridisierte dieses 3,0kb EcoRI-DNA-Fragment des pUC 41-2gen, mit der Insert-DNA des Klons 41-2.

50 Beispiel 5:

Sequenzanalyse des Klons pUC 41-2gen

55 Die Plasmid-DNA pUC 41-2gen wurde mit Hilfe eines Primers und Reverse-Primers von den EcoRI-Randstellen aus sequenziert (E.Y. Chen and P.H. Seaburg (1985) a. a. O.). Daraus konnten von den Enden des 3,0 kb EcoRI- Fragmentes jeweils etwa 250 Basen bestimmt werden. Die Sequenz eines dieser Enden ist dabei identisch mit der Insert-DNA des Klons 41-2. Zur Erstellung einer Restriktionskarte wurden je 0,5

μ g des isolierten 3,0 kb EcoRI-DNA-Fragmentes mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen inkubiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose geblottet und mit nicktranslatierter Insert-DNA des Klons 41-2 nach bekannten Methoden (T. Maniatis, a.a.O.) hybridisiert. Anhand der Größe der zu hybridisierenden Restriktionsfragmente konnte auf die Entfernung verschiedener Restriktionsschnittstellen zur EcoRI-Schnittstelle, die den beiden Klonen 41-2 und pUC 41-2gen gemeinsam ist, geschlossen werden. Ausgehend von der so erstellten Restriktionskarte wurden Restriktionsfragmente des Klons pUC 41-2gen isoliert und zur Sequenzierung in die Phagenvektoren M13mp18 und M13mp19 subkloniert (F. Sanger et al. (1977), Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 74, 5463-5467). Die Sequenz wurde dabei von der dem Gen eigenen EcoRI-Restriktionsstelle in Richtung zum 5'-Ende des Gens bis zu einer Drai-Restriktionsschnittstelle bestimmt.

Die Tabelle 16 zeigt die DNA-Sequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz dieses 1230bp umfassenden Drai-EcoRI-DNA-Fragmentes des Klons pUC 41-2-gen. Die Sequenz von Position 1038 bis 1228 ist identisch mit der Insert-DNA von 41-2. Da die Sequenz des Klons 41-2 und die genomische Sequenz des Klons pUC 41-2gen von unterschiedlichen *P.falciparum*-Stämmen herrühren (Stamm T996 aus Thailand und Stamm FCBR aus Kolumbien), scheint zumindest dieser Genabschnitt sehr konserviert zu sein. Der offene Leserahmen dieser Sequenz beginnt in Position 784 mit einem ATG-Startcodon und endet mit einem TTC-Codon, welches zu der dem Gen internen EcoRI-Restriktionsschnittstelle gehört. Dieser Teil codiert für die 149 N-terminalen Aminosäuren des Proteins. Die Partialsequenz dieses Gens verfügt über keine repetitiven Sequenzanteile. Die abgeleitete Aminosäuresequenz beginnt mit einem Sequenzabschnitt von 18 Aminosäuren, von denen 4 sauer und 5 basisch sind. Gefolgt wird dieser Sequenzabschnitt von einem hydrophoben Teil bestehend aus 11 Resten, der von beiden Seiten durch saure Aminosäurereste flankiert ist. Diese hydrophobe Region könnte als Signalsequenz fungieren. Die Region mit basischen und sauren Aminosäuren vor dieser putativen Signalsequenz ist relativ lang; ähnlich lange Regionen wurden jedoch auch für andere *P.falciparum* Proteine beschrieben (T. Triglia et al. (1987), The EMBO Journal 6, 1413-1419). Die abgeleitete Aminosäuresequenz wurde mit Hilfe des UWGCG-Programms auf hydrophile Regionen und Oberflächenbereiche sowie auf potentielle immunogene Epitop-Bereiche untersucht. Dabei wurden drei hydrophile Bereiche des Proteins ermittelt, die durch die Nukleotidsequenzen der Positionen 890 bis 907, 1079 bis 1093 und 1151 bis 1168 codiert werden.

Der 5' nicht codierende Bereich des Gens ist extrem AT-reich (AT-Gehalt = 88,8 %), wie dies auch für andere *P.falciparum* Gene beschrieben wurde (J.L. Weber (1987), Gene 52, 103-109) und verfügt in jedem der drei Leserahmen über jeweils mehr als 15 Stopcodons. Weiterhin ist in Position 274 eine mögliche CAAT-Box vorhanden, von der 64 Nukleotide "down stream" eine mögliche TATA-Box lokalisiert ist. Diese Strukturen könnten eine mögliche Promotorregion für dieses Gen spezifizieren.

35 Beispiel 6:

Isolierung des vollständigen Gens für 41-2

40 Die Sequenzanalyse des Klons pUC 41-2gen ergab eine Sau3A Schnittstelle, die 947 bp von der EcoRI-Schnittstelle entfernt ist. Durch genomische Southern Blot Analyse wurde ein 2,0 kb großes Sau3A Fragment identifiziert, das mit der Insert-DNA des Klons 41-2 hybridisiert (vgl. Beispiel 4). Somit sollte dieses Sau3A Fragment in 3' Richtung von der EcoRI-Stelle etwa über 1050 bp der genetischen Information des 41-2 Gens verfügen. In einem präparativen Gel wurden 60 μ g mit dem Restriktionsenzym Sau3A geschnittene DNA des Stammes FBCR aufgetrennt und DNA-Fragmente von 1.8 kb bis 2.2 kb isoliert. Diese DNA wurde wie vom Hersteller (Stratagene) angegeben in die Xhol-Stelle des Vektors lambda ZAP kloniert. 10^5 PFU dieser Genbank wurden mit nicktranslatierter Insert-DNA des Klons 41-2 gescreent und etwa 40 Phagenklone wurden identifiziert (vgl. Beispiel 4). Von einem dieser Phagenklone wurde durch automatische Excision nach der Methode von Stratagene ein Bluescript-Vektor (psK⁻ 41-2gen) isoliert.

45 Durch Restriktion dieser Plasmid-DNA mit KpnI und EcoRI konnten zwei DNA-Fragmente von 950 bp und 1050 bp isoliert werden, von denen das 950 bp Fragment im Southern Blot mit der Insert-DNA des Klons 41-2 hybridisierte. Die Plasmid-DNA psK⁻ 41-2 wurde mit Hilfe eines Primers und Reverse Primers sequenziert (E.Y. Chen und P.H. Seeburg (1985) a.a.O.). Die Sequenz, die mit Hilfe des Primers sequenziert wurde, ist identisch mit der Sequenz der Insert-DNA des Plasmids pUC 41-2gen von der Sau3A stelle in 3' Richtung. Das 1050 bp EcoRI DNA Fragment des Plasmids psK⁻ 41-2gen wurde in die EcoRI-Stelle des Vektors pKS⁺ subkloniert (T. Maniatis et al., a.a.O.). Von diesem DNA-Fragment wurde eine Restriktionskarte erstellt. Ausgehend von dieser wurden Restriktionsfragmente in die Bluescript-Vektoren subkloniert und nach der ssDNA Präparation sequenziert. (Instruction manual von Stratagene). Die Sequenz wurde dabei

von der EcoRI-Restriktionsstelle des 41-2 Gens in 3' Richtung bis zur Sau3A-Stelle vollständig bestimmt. Die Tabelle 17 zeigt in Fortsetzung zur Tabelle 16 die DNA-Sequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz dieses 1050 bp umfassenden EcoRI-Sau3A-DNA-Fragmentes des Klons pSK⁻ 41-2gen. Dieser Genabschnitt codiert lediglich noch für 35 zusätzliche Aminosäuren, bis ein TAG Stopcodon folgt. Der 3' nicht codierende Bereich des Gens ist extrem AT-reich (AT-Gehalt = 84,7 %) und enthält in jedem der drei Leserahmen jeweils mehr als 11 Stopcodons. Die S1-Mapping-Technik (F.M. Ausubel et al. (1987), Current Protocols in Molecular Biology, Harvard Medical School, Boston) ergab keinerlei Hinweise für einen Intron-Exon-Aufbau dieses Gens. Schließlich wurde durch Northern Blot Analyse (T. Maniatis et al., a.a.O) eine mRNA des Schizontenstadiums in der Größe von 1.6 kb detektiert. Daher muß angenommen werden, daß das 41-2 Gen nur einen einzigen codierenden Abschnitt von 552 bp besitzt (AT-Gehalt = 73 %). Dieser codiert für ein Antigen von 21512 Dalton, welches eine Signalsequenz (vgl. Beispiel 5), aber keine repetitiven Abschnitte besitzt. Dieses Antigen verfügt neben der Signalsequenz über zwei weitere hydrophobe Abschnitte in den Aminosäurepositionen 73 bis 85 und 130 bis 147, die eventuell eine Funktion für die Membranverankerung besitzen.

75

Beispiel 7:

20 Expression der Inserts der Klone 41-1 bis 41-5 sowie 41-7, 41-10 und 41-14 in dem Vektor pEX31

Die Insertfragmente der Klone 41-1 bis 41-5, 41-7, 41-10 und 41-14 wurden nach Restriktion mit EcoRI gelektrophoretisch isoliert, in den dephosphorylierten, mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdauten Vektor pEX31b ligiert (K. Streb et al. (1986) Journal of Virology 57, 983-991) und in kompetente, das Plasmid pCI857 (F. Remaut et al. (1981), Gene 15, 81-93) enthaltende C600-Bakterien transformiert. Einzelne Kolonien wurden mittels SDS-PAGE auf Expression der Plasmodien-spezifischen DNA-Sequenzen als MS2-Polymerase-Fusionsproteine hin untersucht. Die Induktion erfolgte durch Temperaturerhöhung nach der Methode von H. Küpper et al. (in Y. Ikeda and T. Beppu (ed). Proceedings of the Fourth International Symposium on Genetics of Industrial Mikroorganisms (1982), Kyoto Kodansha Ltd., Tokyo). Alle 8 Fragmente konnten in hoher Ausbeute zur Expression gebracht werden.

Beispiel 8:

35

Reinigung der Expressionsprodukte

Kulturen von transformierten Bakterien wurden jeweils in 1 l LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin bei 28 °C 20 h heftig geschüttelt. Nach Zugabe von 4 l auf 42 °C erwärmtem LB-Medium wurde erneut 4 h bei 42 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, in 200 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) resuspendiert und mechanisch aufgeschlossen. Die löslichen Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt und die Sedimente, die die Expressionsprodukte enthielten, nach zweimaligem Waschen mit PBS nacheinander mit steigenden Harnstoffkonzentrationen (von 1 M bis etwa 5 M) gewaschen, bis die Fusionsproteine in Lösung gingen. Anschließend wurde mit fallenden Harnstoffkonzentrationen bis zu der Harnstoffkonzentration dialysiert, die ausreichte, um die Expressionsprodukte in Lösung zu halten. Dieses Verfahren führte zu einem Reinheitsgrad von 60-80 %.

Beispiel 9:

50

Nachweis des Antigens, das durch 41-2gen codiert wird

Mittels Kaninchen-Antiseren, die gegen das Expressionsprodukt des Klons 41-2 gerichtet sind, ließ sich im Western Blot mit Schizontproteinen kein Malariaantigen eindeutig nachweisen. Deshalb sollte ein größeres DNA-Fragment des Gens 41-2 exprimiert werden. Dazu wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme AluI und EcoRI ein 383 bp Fragment des 41-2 Gens isoliert, daß 70 % der codierenden Region beinhaltet. Dies wurde in die Smal-und EcoRI-Stellen des Plasmids pUC18 subkloniert. Aus diesem Plasmid wurde mit

Hilfe des Restriktionsenzymes EcoRI ein 401 bp Fragment isoliert und in die EcoRI-Stelle des Vektors pEX31b kloniert. Nach der Transformation konnten Bakterienkolonien identifiziert werden, welche ein Fusionsprotein von 26 kD exprimieren (vgl. Beispiel 7). Dieses wurde gereinigt (vgl. Beispiel 8) und zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt. Die Antiseren erkennen im Western Blot mit Schizontenproteinen 5 ein 29 kD Antigen, das durch das 41-2 Gen codiert wird. Die Differenz von dem kalkulierten Molekulargewicht von 22 kD zu dem Molekulargewicht von 29 kD in SDS-Polyacrylamidgelen kann durch Sekundärmodifikation erklärt werden. So besitzt das Protein in dem Asparagin-Rest in Position 166 eine N-Glykosylierungsstelle.

Daß von dem Klon 41-2 ein recht kleines antigen codiert wird, wird auch durch Northern Blot Analyse 10 bestätigt. So wurde im Schizontenstadium von P.falciparum eine mRNA von 1,6 kb detektiert, welche mit der Insert-DNA des Klons 41-2 hybridisiert. Die Northern Blot Analyse wurde nach bekannten Methoden (T. Maniatis et al., a.a.O.) durchgeführt.

15 Beispiel 10:

Antigenzuordnung weiterer Klone

20 Antiseren gegen die gereinigten Fusionsproteine der Klone 41-1, 41-3, 41-4, 41-5, 41-7 und 41-10 wurden dazu benutzt, die korrespondierenden Antigene durch Western Blot Analyse mit Schizontproteinen zu identifizieren. Dabei ließen die Antiseren gegen die Fusionsproteine der Klone 41-1, 41-3 und 41-4 keine eindeutigen Identifizierungen zu. Die Insert-DNA des Klons 41-5 kann einem 96 kD Antigen zugeordnet werden. Eine Dreiergruppe von 96 kD Antigenen von P.falciparum wurde beschrieben (H. Jouin et al. 25 (1987), Inf. Imm. 55, 1387-1392). Antiseren, die gegen ein Expressionsprodukt des Klons 41-10 gerichtet sind, erkennen zwei Antigene von 113 und 140 kD. Die Reaktion mit dem 113 kD-Antigen wurde als Kreuzreaktion mit dem SERPI Antigen (vgl. Beispiel 2) identifiziert, das mit einem protektiven Antigen identisch ist. 41-10 codiert somit eine 140 kD Protein von P.falciparum.

Gemeinsam ist all diesen Genen, daß die von ihnen codierten Antigene oder Teile davon mit einem 30 Serum reagieren, das gegen eine protektiv wirkende 41 kD Proteinbande gerichtet ist. Nur der Klon 41-7, der neben dem Klon 41-2 die stärkste Reaktivität mit dem Antiserum gegen die 41 kD Proteinbande besitzt, kann eindeutig einem 41 kD Protein zugeordnet werden.

Antiseren, die gegen das Fusionsprotein des Klons 41-7 gerichtet sind, erkennen im Western Blot mit Schizontproteinen eindeutig die 41 kD Proteinbande, die auch von dem Ausgangsserum erkannt wird. 35 Dieser Klon scheint somit ein Teilfragment des 41 kD Antigens zu codieren. Daß die untersuchten Klone Teillequenzen verschiedener Gene tragen, wurde für die Klone 41-1, 41-2, 41-3, 41-7, 41-10, 41-14 und 41-15 auch durch Southern Blot Analysen bestätigt.

40 Beispiel 11

Herstellung einer genomischen lambda gt11 Genbank

45 2 µg DNA des P.falciparum Stammes FCBR wurden über Nacht bei 37 °C mit 14 Einheiten des Restriktionsenzymes EcoRI in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol und 40 % Glycerin inkubiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Unter diesen Bedingungen zeigt das Restriktionsenzym EcoRI Stern-Aktivität, wodurch sich DNA-Fragmente von etwa 50 bp bis 10 kb bilden. Die DNA-Region zwischen 500 bp und 7 kb wurde elektroeluiert und nach der Methode von T.V. Huynh et al. (1985; in DNA cloning Vol. I, a practical approach, ed. D.M. Glover) in den Vektor lambda gt11 kloniert. Es wurde eine 50 Genbank von 5 x 10⁵ rekombinanten Phagenklonen hergestellt, welche amplifiziert wurde.

Beispiel 12:

55

Isolierung und Sequenzierung des 41-7 Gens

Da der Klon 41-7 tatsächlich für ein Teilfragment eines 41 kD Proteins codiert (vgl. Beispiel 10), sollte das vollständige Gen isoliert werden. Dazu wurde die genomische lambda gt11 EcoRI⁺ Genbank (vgl. Beispiel 11) nach bekannten Methoden (T. Maniatis et al., a.a.O.) mit nicktranslatierter Insert DNA des Klons 41-7 gescreent. Daraus resultierten drei lambda gt11 Klone, von denen mit Hilfe der Restriktionsenzyme 5 EcoRI und Sall jeweils ein 3,3 kb großes Insert isoliert werden konnte. Der malariaspezifische Anteil des Inserts beträgt 2,3 kb. Von diesem DNA-Fragment wurde eine Restriktionskarte erstellt. Ausgehend von dieser wurden Subfragmente zur Sequenzierung in die Bluescript Vektoren (Stratagene) kloniert. Die vollständige DNA-Sequenz dieses 2,3 kb großen malariaspezifischen Fragmentes konnte aufgeklärt werden. Tabelle 18 zeigt die DNA-Sequenz des 41-7 Gens mit der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz. Das 10 Gen besitzt keine Introns. Von der 5' nicht codierenden Region wurden 525 Basenpaare (AT-Gehalt = 84,2 %) und von der 3' nicht codierenden Region 772 Basenpaare (AT-Gehalt = 84,2 %) ermittelt. Der mittlere Abschnitt besteht aus 1086 Basenpaaren (AT-Gehalt = 64,4 %) und codiert für 362 Aminosäuren. Das berechnete Molekulargewicht dieses Gens von 39314 D stimmt gut mit dem gelelektrophoretisch ermittelten Molekulargewicht von 41 kD überein. Dieses Gen wird in eine 2,4 kb große mRNA transkribiert, was durch 15 Northern Blot Analyse nach bekannten Methoden ermittelt wurde (T. Maniatis et al. a.a.O). Durch Southern Blot Analyse (vgl. Beispiel 4) konnte abgeleitet werden, daß nur eine Kopie dieses Gens pro *P.falciparum* Genom existiert. Außerdem wurde gefunden, daß dieses Gen bei verschiedenen *P.falciparum* Stämmen (FCBR aus Kolumbien, Palo Alto aus Uganda, SGE2 aus Zaire, ItG₂G₁ aus Brasilien und FVOR aus Vietnam) konserviert ist. Zudem ist die malariaspezifische DNA-Sequenz des Klons 41-7 (Stamm T996 aus 20 Thailand) identisch zu der Teilsequenz des aus dem FCBR-Stamm isolierten Gens von Position 464 bis 729. Der Klon 41-7 codiert somit für die 88 N-terminalen Aminosäuren des 41 kD Proteins.

Aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz ist ersichtlich, daß das 41 kD Protein keine Signalsequenz und keine repetitiven Abschnitte enthält. Mit Hilfe des UWGCG (University of Wisconsin, Genetic Computer Group) Programms wurde diese Aminosäuresequenz auf homologe Proteine innerhalb der NBRF-Protein-Datenbank untersucht. Dabei wurde gefunden, daß das 41 kD Protein zu 66 % homolog zur Leber-Aldolase des Menschen (M. Mukai et al., (1985), Nucleic Acid Res. 13, 5055-5069), zu 66 % zur Leber-Aldolase aus der Ratte (K. Tsutsami et al. (1984) J. Biol. Chem. 259, 14572- 14575), zu 68 % homolog zur Muskel-Aldolase aus dem Kaninchen (D.R. Tolan et al. (1984), J. Biol. Chem. 259, 1127-1131) und zu 61 % homolog zur Aldolase aus *Trypanosoma brucei* (C.E. Clayton (1985) EMBO J. 4, 2997-3003) ist. Das 41 kD Protein scheint somit die *P.falciparum* Aldolase zu sein.

Beispiel 13:

³⁵ Schutzversuch im Tiermodell: Immunisierung von *Aotus lemurinus griseimembra* (Karyotyp VI)

Dieses Experiment wurde durchgeführt, um die Wirksamkeit der beschriebenen Expressionsprodukte bezüglich der Induktion von schützender Immunität in für *P. falciparum* empfänglichen Affen zu prüfen. Als 40 Versuchsimpfstoff diente eine Kombination der Expressionsprodukte der immunologisch stark reagierenden Klone 41-1, 41-2 und 41-3.

1. Versuchsanordnung

⁴⁵ 6 Aotusaffen der o.g. Spezies (1000-1500 g Körpergewicht, männliche und weibliche Tiere aus der Zucht der Behringwerke AG) wurden randomisiert und in 2 Gruppen zu je 3 Tieren aufgeteilt.

Fusionsproteine der Klone 41-1, 41-2 und 41-3 wurden in PBS 3 M Harnstoff gelöst und im Verhältnis 1:1:1 gemischt. (Endkonzentration: 300 µg Protein/ml). 3 Tiere wurden in Abständen von 3 Wochen 3 x mit jeweils 1 ml der kombinierten Fusionsproteine subkutan immunisiert. Als Adjuvans diente eine 10%ige Zumischung von 50% Al(OH)₃/ 45% Lecithin/5% Saponin zum Antigen.

3 Tiere der Infektions-Kontrollgruppe erhielten ebenfalls nach o.g. Schema jeweils eine Injektion aus PBS 3 M Harnstoff + Adjuvans ohne Antigenkomponente.

Um eine möglichst gleichstarke experimentelle *P.falciparum*-Infektion in den Tieren zu gewährleisten, 55 wurden alle Affen acht Tage nach der letzten Immunisierung splenektomiert (erhöhte Suszeptibilität).

Am 67. Tag nach der 1. Vaccinierung wurden alle 6 Tiere mit 5 x 10⁶ parasitierten Erythrozyten intravenös infiziert. Als Challenge-Stamm wurde *P. falciparum*-Palo Alto (Uganda) gewählt, der, in vitro auf *Aotus*-Erythrozyten adaptiert, von einem splenektomierten Spendertier (4 % Parasitätämie) direkt auf die

Versuchstiere übertragen wurde. Dieser Stamm zeichnet sich durch eine hohe Infektiosität im Vergleich zu anderen *P. falciparum*-Isolaten aus. Es ist außerdem interessant zu erwähnen, daß dieser Stamm heterolog zu dem für die Gewinnung der Immunisierungsantigene verwendeten Stamm T996 (Thailand) bezüglich Provenienz und Serotyp ist.

5 Während der gesamten Verlaufsstudie (vor und nach Immunisierung sowie nach Challenge) wurden physiologische, parasitologische, serologische und klinischchemische Parameter regelmäßig untersucht.

2. Ergebnisse

10

Während der gesamten Immunisierungsphase zeigten sich keine pathologischen Veränderungen aller untersuchten physiologischen (klinisches Erscheinungsbild, Temperatur, Gewicht) und klinisch- chemischen Parameter (Erythrozyten, Hämatokrit, Blutsenkung, Serumenzyme GPT und GOT). Zusätzliche sicherheitspharmakologische Untersuchungen (akute subkutane Toxizität in der Maus, lokale Verträglichkeit am Affen 15 nach Richtlinien der Europäischen Pharmakopoe) bescheinigten der verwendeten Impfstoff-Präparation ausreichende Sicherheit und Verträglichkeit.

2.1 Parasitämie

20

Hauptparameter für die Wertbemessung eines induzierten Schutzes (Protektion) ist der mikroskopische Nachweis parasitierter Erythrozyten im peripheren Blut des Versuchstieres.

25

Bereits vom 7.-10. Tag nach der Infektion konnten vereinzelt parasitierte Erythrozyten (kleiner als 1 Promille) im Giemsa-gefärbten Blutausschiff der nicht immunisierten Tiere nachgewiesen werden. Die immunisierten Tiere zeigten ein verzögertes Auftreten von Parasiten vom 10.-15. Tag p.i., erreichten maximale Parasitämien von 1-2 % und kontrollierten die Infektion spontan. Ein Tier starb interkurrent an Pneumonie.

30

Während ein Tier der nicht immunisierten Gruppe eine maximale Parasitämie von 4,5 % selbst kontrollieren konnte, mußten die beiden anderen Tiere nach Erreichen einer Parasitämie von > 10 % mit Mefloquin (R) (Hoffmann La Roche) behandelt werden, um einen tödlichen Infektionsverlauf zu verhindern. Der Challenge-Stamm Palo Alto erwies sich in vorausgegangenen Infektionsversuchen als Chloroquinresistent.

35

Figur 1 zeigt links den Verlauf der Parasitämie in Aotus-Affen nach Immunisierung mit einer Kombinationsvaccine bestehend aus Fusionsproteinen der Klone 41-1, 41-2 und 41-3, rechts den der Kontrolle (nicht immunisierte Tiere).

40

45

50

55

TABELLE 1:

Nukleotidsequenz des malaria-spezifischen DNA-Inserts
des Klons 41-1 und abgeleitete Aminosäuresequenz

5	10	30	50
	TAAAAATCTTATGTATTTTAAACAAAAGAAAATAAAAAGGTAAGGTCAATCAAATAATTCA		
	LysSerLeuCysIlePheLysGlnArgAsnLysLysValArgSerSerAsnAsnSerS		
10	70	90	110
	CTTTCTTAATTGATTTAGAAAACACATACGAATAATATCAATATGTTAACAGAAAATC		
	erPheLeuIleAspPheArgAsnSerHisThrAsnAsnIleAsnMetLeuThrGluAenG		
15	130	150	170
	AAAAGTTAAATAATGTATTATTEAATAAGAAAATTCAAGATGGATGAAAATCAGGAACGTG		
	IleLysPheAsnAsnValLeuLeuAsnLysGluIleGlnMetAspGluAsnGlnGluArgG		
20	190	210	230
	AATTTCAATTGATGATTGTTAAATGAAACTGCCTGAAACATAATGCATCTAATTAAAHAA		
	IuPheSerIleAspAspCysLeuMetAsnCysLeuLysHisAsnAlaSerAsnLeuLysT		
25	250	270	290
	CCAATGAAAGATTATGAAAAGATATTGTAATGAAGACAAAAATATTGAATCCAGATTATAAGC		
	hrAsnGluAspTvrGluArgTvrCysAsnGluAspLysIleLeuAsnProAspTvrLysP		
30	310	330	350
	CTTCAGAATCTAGAAAACCTGGGAGAAAAATTTCAGCATCTGATTTACTAAATCTCAAGATAGTA		
	roSerGluSerArgLysLeuGlyGluLysPheLeuGlnLysSerGlnLysGluLeuTvrT		
35	370		
	ATTCTTATGC		
	yrSerTyr		

TABELLE 2:

Nukleotidsequenz des malaria-spezifischen DNA-Inserts des
Klons 41-2 und abgeleitete Aminosäuresequenz

40	10	30	50
	AACATGTGTGAAATATTTATTCAGCATTCTGATTTACTAAATCTCAAGATAGTA		
	HisValTrpLysTyrLeuPheGlnHisSerSerAspLeuLeuLysSerGlnAspSerI		
45	70	90	110
	TTTATGAGTATATGATATGTGATAAAAATATTATTAAATAAAATTATAAAATGTACCAA		
	IeTyrGluTyrMetIleCysAspLysAsnIleLeuLeuAsnLysPheIleAsnValProL		
50	130	150	170
	AAGATTATGGAAATATAAATTGTGCTGCCTTGCAAGCAGGTATTGTTGAAGGCTTCCTCT		
	ysAspTyrGlyAsnIleAsnCysAlaAlaPheAlaAlaGlyIleValGluGlyPheLeuC		
55	190		
	GTAGTTCTGAATTC		
	ysSerSerGluPhe		

TABELLE 3:

Nukleotidsequenz des malaria-spezifischen DNA-Inserts des Klons 41-3 und abgeleitete Aminosäuresequenz

5	10	30	50
	CAGTAAAAATTAAAAAGAAAAATTAAAGAAAAATAAAGGAAACC	ACTGATGAAG	
	ValLysIleLeuLysLysLysAsnLeuArgLysIleLys	GluThrThrAspGluG	
10	70	90	110
	AGAAAACCTCAGATAATGTTCTCAAATGTATGAAAGAAAAGGTGGACC	ATTACCA	CAC
	luLysThrSerAspAsnValSerGlnMetTyrGluArgLysGly	GlyProLeuProProP	
15	130		
	CCGAACCTTAGAAAAACA		
	toGluLeuArgLys		

TABELLE 4:

Nukleotidsequenz des malaria-spezifischen DNA-Inserts des Klons 41-4 und abgeleitete Aminosäuresequenz

25	10	30	50
	GTATACTGAATTTAGGACAATATCATAATGTTCCCCATGTATTCAAAGATTATG	A	
	IleProGluPheLeuGlyGlnTyrHisAsnValProHisValPheLysAspTyrMetS		
30	70	90	110
	GTTCCAATGATTTATAAGTGGTATAATAATATAAAATGAATCAGATGCT	CTTTTAATA	
	erSerAsnAspPheIleSerGlyIleAsnAsnIleAsnGluSerAspAlaLeuPheAsnA		
35	130	150	
	ACATACAAATATATAAACCAAGCGAATGACCAAGAAGAAAACAATT		
	snIleGlnTyrIleAsnGlnAlaAsnAspGlnGluGluAsnLys		

TABELLE 5:

Nukleotidsequenz des malaria-spezifischen DNA-Inserts des Klons 41-5 und abgeleitete Aminosäuresequenzen

45	10	30	50
	TGTTTGATAATAGTGATTTATTAAATCAAATAATGGATTCTAATAAACAAATTAAAAAGT		
	PheAspAsnSerAspPheIleLysSerIleMetAspSerAsnLysGlnLeuLysL		
50	70	90	110
	TAAGAGAACAAAATTCTGATTAAATCATATTTAAATGATTCTCAGACTTAAACAAT		
	euArgGluGlnAsnSerAspLeuAsnHisIleLeuAsnAspSerGlnThrLeuGlnS		
55	130	150	170
	CTTTTGAAATGATTAAGAACATCCATCTTGATGAAAGAATTAATGAAAATACTGATAGAG		
	erPheGluMetIleLysAsnProSerLeuMetLysGluLeuMetLysAsnThrAspArgA		
	190		
	CTATTAGTAATATTGAAGGCCATACC		
	IlaileSerAsnIleGluAlaIle		

TABELLE 6:

Nukleotidsequenz des malaria-spezifischen DNA-Inserts des Klons 41-6 und abgeleitete Aminosäuresequenz

5

10 30 50
TCGTTGCCTTCCCTTGATGATAACGCAATGAGATAAAACAAAAATTGACACGTTT
ValValLeuSerPheGlyAspLysArgAsnGluIleLysGlnLysIleAspThrPheC

10

70 90 110
GTGGTGTAAAGTAATGAAGAAAAGGAGAAACTAAAGGAACAATGGAAATGCTATGAAGCTA
ysGlyValSerAsnGluGluLysGluLysLeuLysGluGlnTrpLysCysTyrGluAlaL

15

130 150
AATATGTAAGGAAGATAATAAAAGTAAAG
ysTyrValLysGluAspAsnLysSerLys

20

TABELLE 7:

Nukleotidsequenz des malaria-spezifischen DNA-Inserts des Klons 41-7 und abgeleitete Aminosäuresequenz

25

10 30 50
TGAATGCCCAAAAAATTACCAGCAGATGTTGCCGAAGAATTAGCAACCACGCCAAA
AsnAlaProLysLysLeuProAlaAspValAlaGluGluLeuAlaThrThrAlaGlnL

30

70 90 110
AGCTTGTCAAGCTGGAAAGGGATTAGCTGCTGATGAATCAACACAAACCATTAAAGA
ysLeuValGlnAlaGlyLysGlyIleLeuAlaAlaAspGluSerThrGlnThrIleLysL

35

130 150 170
AAAGATTGACAAACATCAAATTAGAGAACACAATAGAAAACAGAGCTAGCTACAGAGATT
ysArgPheAspAsnIleLysLeuGluAsnThrIleGluAsnArgAlaSerTyrArgAspL

40

190 210 230
TATTATTTGGAACTAAAGGATTAGGAAATTCAATTCAAGGAGCAATTATTGAAGAAA
euLeuPheGlyThrLysGlyLeuGlyLysPheIleSerGlyAlaIleLeuPheGluGlut

45

250
CATTATTCAAAAGAACATGAAAGCCGGT
hrLeuPheGlnLysAsnGluAlaGly

50

55

TABELLE 8:

Nukleotidsequenz des malaria-spezifischen DNA-Inserts des Klons 41-8 und abgeleitete Aminosäuresequenz

5

10

TAACATTTCTGTAGATACAAAACAAAATTAAATGCATCTTATTCTAGTGGACAAGAAA
 ThrPheSerValAspThrLysGlnAsnLeuAsnAlaSerTyrSerSerGlyGlnGluA

10

70

90

110

ATAAAACAAAATGAATCTGATGGAAAAGAAAAATGAAGAAGATGAAGAAAATAAGGTATATG
 snLysGlnAsnGluSerAspGlyLysGluAsnGluGluAspGluGluAsnLysValTyrA

15

130

150

170

ATTTAATACTGGAAAATATAGAACCTAACAAAAAAATACCCATCATAAAAATCGTAAAG
 spLeuIleLeuGluAsnIleGluProAsnLysLysIleProIleIleLysIleValLysG

20

190

210

230

AAATAAAAAAAAGATCTTAATTAAAACAAGCAAAGGATTTAGTTGATAATTGCCACA
 lileLysLysAspLeuAsnLeuLysGlnAlaLysAspLeuValAspAsnLeuPro

25

TABELLE 9:

Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des malaria-spezifischen Inserts-DNA des Klons 41-9

30

35

10 30 50
 AAAATAAAAATTATACAGGTAATTCTCCAAGTGAAAATAAGAAAGTTAACGAAAGCTT
 AsnLysAsnTyrThrGlyAsnSerProSerGluAsnAsnLysValAsnGluAlaL

70

90

110

TAATAATCTTACGAAAATTCTCCCAGAACGAAAAGTTACAACAGTTGTAACTCCACCTC
 euLysSerTyrGluAsnPheLeuProGluAlaLysValThrThrValValThrProG

40

130

150

170

AACCAGATGTAACCTCCATCTCATTATCTGTAAGGGTAAGTGGTAGTTCAAGGATCCACAA
 InProAspValThrProSerProLeuSerValArgValSerGlySerSerGlySerThrL

45

190

210

230

AAGAAGAACACAAATACCAACTCAGGCTTTATTAAACAGAATTACAACAAAGTAGTAC
 ysGluGluThrGlnIleProThrSerGlySerLeuLeuThrGluLeuGlnGlnValValG

50

250

270

290

AATCACAAAATTATGACGAAGAAGATGATTCTTAGTTGTATTACCCATTGGAGAAT
 InSerGlnAsnTyrAspGluGluAspAspSerLeuValValLeuProIlePheGlyGluS

55

310

330

350

CCGAAGATAATGACGAATATTAGATCAAGTAGTAACGGAGAAGCAATATCTGTCACAA
 erGluAspAsnAspGluTyrLeuAspGlnValValThrGlyGluAlaIleSerValThrM

370

390

TGGATAATATCCTCTCAGGATTGAAAATGAATATGA
 etAspAsnIleLeuSerGlyPheGluAsnGluTyr

TABELLE 10:

Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des
malaria-spezifischen Inserts-DNA des Klons 41-10

5

10	30	50
AATCTCATTCTGACGAAAATATTGTAACTTTACAAGGAAAACCTAGAAATAACAGCTATCT		
SerHisSerAspGluAsnIleValThrLeuGlnGlyLysLeuArgAsnThrAlaIleC		
10		
70	90	110
GTATAAAAGAACATGTTGATGAATGGATATTAAATAAAAGAGGTCTAACATTACCTAGTGAAT		
ysIleLysAsnValAspGluTrpIleLeuAsnLysArgGlyLeuThrLeuProSerGluS		
15		
130	150	
CACCTAATGAATCACCTAGTGAATCAGATAGTTATCTTAA		
erProAsnGluSerProSerGluSerAspSerTyrLeu		

20

TABELLE 11:

Nukleotidsequenz des malaria-spezifischen DNA-Inserts des
Klons 41-12 und abgeleitete Aminosäuresequenz

25

10	30	50
ATGAAGGAGAAGAATTAATATTAAATGATGATCAAATAAAATTACATATTGATACATTG		
GluGlyGluGluLeuIleLeuAsnAspAspGlnAsnLysLeuHisIleAspThrPheG		
30		
70	90	110
AAAAAATACAAATATCTCATTGTAAAAATATTAATAATGACAAATTGTTATAAAAAAATA		
luLysTyrLysTyrLeuIleCysGluAsnIleAsnAsnAspLysPheValIleLysAsnA		
35		
130	150	170
ATCAAATTACAAACATTTGAAAACTTTGAAAAACCAACAAAATTGAAATAA		
snGlnIleThrPheGluAsnPheLeuLysAsnGlnGlnAsnPheGluIle		

40

45

50

55

TABELLE 12:

Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des
malaria-spezifischen Inserts des Klons 41-13

5

	20	40	60
10	TAAATAATGAAAATATGGATAAACAAAAATGTTAATATTCAAAATGAAGGTAATGGTTTA AsnAsnGluAsnMetAspLysGlnAsnValAsnIleGlnAsnGluGlyAsnGlyPheA		
	80	100	120
15	ATAATAATAAAAATAATGATCTTTAAATGTTATATATCACCTAATATGATTAATC snAsnAsnLysAsnAsnAsnAspLeuLeuAsnValTyrIleSerProAsnMetIleAsnH		
	140	160	180
20	ATTCTTATCTTCAACTTGTAAAAAAAAAAATAAGAAGATAACAAAATGAATGACAATA isSerLeuSerSerThrCysGluLysAsnLysGluAspAsnLysMetAsnAspAsnL		
	200	220	240
25	AATTCTTAATAGCAGTAGTAAAATGAAAATTCCAGAGATAAGTACGAACAACTCAAATG ysPheLeuAsnSerSerLysMetLysIleProGluIleSerThrAsnAsnSerAsnG		
	260	280	300
30	AAAAGATTGTTAATGTGTCAAATGATGAAATGTTAGTATATCATAATTAAACCGTATTAA luLysIleValAsnValSerAsnAspGluMetLeuValTyrHisAsnLeuThrValLeuA		
	320	340	360
35	ATGTAAAGGAACAAGGAGGTGTAAACAGAAGAATCGAGCTGTATAAAACGCACATATTTG snValLysGluGlnGlyGlyValThrGluSerSerCysIleLysArgThrTyrPheV		
	380	400	420
40	TGGATCAATTTATGATTCATATAATATGAGAAATGAAAAATAACAGATGATAATATGC alAspGlnPheTyrAspSerTyrAsnMetArgAsnGluLysIleThrAspAspAsnMetG		
	440	460	480
45	AAGTAGAAGATATATAATGAAAGGAAAATATAAAAGAACTCTAAAGGTGATGGTC lnValGluAspIleTyrAsnValLysGluAsnIleLysArgThrLeuLysGlyAspGlyP		
	500	520	540
50	CTGATGATGTCAAAACGAATATGCTGAGTGAAGATAATAGTTATGCAAGTGGTTATGGG roAspAspValLysThrAsnMetLeuSerGluAspAsnSerTyrAlaSerGlyLeuTrpG		
	560	580	600
55	GTAACGAAATAAAACTTATTAGTAATAATGAAAATTGTTAAATAGCTATGATATATCAT lyAsnGluIleAsnPheIleSerAsnAsnGluAsnCysLeuAsnSerTyrAspIleSerC		
	620	640	
	GTGATGAGAAATATATCCCACAGGA ysAspGluLysTyrIleProAsnGluGluGln		

50

55

TABELLE 13:

Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des
malaria-spezifischen Inserts des Klons 41-14

5

10	30	50
ACAAACAATATGAAACAGAATAAAATAGTTAACAAATAAAAATAATATTAAACCCTATAAATC AsnAsnMetAsnArgIleAsnSerLeuAsnAsnLysAsnAsnIleAsnProIleAsnG		
70		
90		
110		
AATAACAATGATGAAAAACAAAACCTACTAACGNCCATCTCAGTYCAATCAAGTAAATT IleTyrAsnAspGluLysGlnAsnLeuLeuAsnXxxHisLeuGlnXxxAsnGlnValAsnT		
130		
150		
170		
ATNATAATAACCTTGTGAATGGCYITCATANAANNAATTTTAACATAATAATTATA yrXxxAsnAsnLeuValAsnGlyXxxHisXxxXxxLysPheLeuSerAsnAsnAsnTyrI		
190		
210		
230		
TTAAATACTACAGATATTAAATGGAAATAATATGATTAGTCATAATGATCATATGAATAATA LeAsnThrThrAspIleAsnGlyAsnAsnMetIleSerHisAsnAspHisMetAsnAsnL		
250		
270		
290		
AATTATAACAGTAATATAAACATAATTATTATTATAATAGGGCTAACATGAAATTCTA ysLeuTyrSerAsnIleAsnAsnAsnTyrTyrAsnArgAlaAsnAsnGluIleProA		
310		
330		
350		
ATAATAATAGTAACAATCATAATAATAATTCAATATATATGAATCCAATACCAAACCA snAsnAsnSerAsnAsnHisAsnAsnAsnPheAsnIleTyrGluSerLysTyrGlnThrM		
370		
390		
410		
TGATTCTAACAAACACATAGGACAAGATCTAAAACAACAAATAATAATTATAATGAAA etIleHisAsnAsnAsnIleGlyGlnAspLeuLysGlnGlnIleAsnAsnTyrAsnGluA		
430		
450		
470		
ATACATCTTCTAATAATAATTAAAGTATATCTCAATTACTTGAGGGAAATACAACAAATT snThrSerSerAsnAsnAsnLeuSerIleSerGlnLeuLeuGluGlyAsnThrAsnPheI		
490		
510		
530		
TAAATATTCTAATAACATTATTAATACGAATTATTCTAATGATTTCATCA IleAsnIleSerAsnThrPheIleAsnThrAsnTyrSerAsnAspPheHis		

40

45

50

55

TABELLE 14:

Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des
malaria-spezifischen Inserts des Klons 41-15.

TABELLE 15:

³⁰ Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des
malaria-spezifischen Inserts des Klons 41-17

20	40	60
GCACTGCCACCCTTGTGCGGAAGAATTGCACCAGCTCGGCTATTCACTGGCGCTGGGTC		
Thr Ala Thr Leu Val Ala Glu Glu Leu His Gln Leu Gly Tyr Ser Leu Ala Leu Gly A		
35		
80	100	
GCGAAGTAGTTAACGAAAGTAGCCGGATGGGATTACCTGATGAATTC		
rg Glu Val Val Asn Glu Ser Ser Arg Met Gly Leu Pro Asp Glu Phe		

45

50

55

TABELLE 16:

5 Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des 5' Endes
 des P. falciparum (Isolat FCBR) Genes, das durch das Insert
 des Klones 41-2 spezifiziert wird.

10	30	50	
TTTAAAAAATTTATAAATAATTTCTCTTTATTTAATACATCTATAAGTATATATG			
10	30	50	
TAATAATTGATACACAAGAAATGTGTATTTTAATATATATATATATATATATATAT			
15	130	150	170
ATATATATATATATATATATATATATATGATATATATAATACATTATTTA			
15	190	210	230
TTCCATAATTATTAATAAATAATTATATTTATTTATTTTATTTTATTTTATTTG			
20	250	270	290
TATATATTAATCTTTCAATGGAATAAAATTCAATCGGATCGTTATATAAAACTTTATTA			
20	310	330	350
TATCAAATAAAACACTTTTATAATAATACGAAAATATATTCCTIATTTTATGTTT			
25	370	390	410
CAAAATTAGTAGACTTATAATATTATGGATAACATTAACAAATAAAATATTATG			
30	430	450	470
AGTATAATATGTAATTATTTTTTACAGTTATATGTTATGAACATATAATG			
30	490	510	530
TGATAAAATAAAATTGATTAATTATTATATAATTACTCTGTAATTATTAATG			
35	550	570	590
GTATATTATATATATATAATTATTTTATATTATTTGAATAAAATATTAAATAAA			
35	610	630	650
AAFTTTGTGTTGGTAAATCATAATAAGTGTAACTTCATAATTCTCATTA			
40	670	690	710
ATAGAAATGAAATATAATATTACGACAGTACATATATATATGTATATTAAAAAA			
40	730	750	770
AAATAAAAATAACACATATATAATATATATATATTGATAATATATGTTTA			
45	790	810	830
AGTATGGATAAAATCAAAAGTCCATAGAGAAAGAATTAAATAGGATAAAACAGGATGTG			
MetAspLysSerLysSerSerIleGluLysGluLeuAsnArgIleLysGlnAspVal			
45	850	870	890
AGCTTAAGCGCATTAGTATCCTCTTTAGTGAAATGGTACAATATTGTTATATAAAAGT			
SerLeuSerAlaPheSerIleLeuPheSerGluMetValGlnTyrCysLeuTyrLysSer			
50	910	930	950
AAAAGAGGATATCGAATAGAACAGATTGTTACATGAAATGGGTTACGTGTAGGTTATAAA			
LysArgGlyTyrArgIleGluAspCysLeuHisGluMetGlyLeuArgValGlyTyrLys			
55	970	990	1010
TTAAATGAATATTAACATATAAGAATAAAAGTGAAGAAGCATAAATATTATTAATATT			
LeuAsnGluTyrLeuThrTyrLysAsnLysValLysArgSerIleAsnIleIleAsnile			

TABELLE 16:

5

1030 1050 1070
 TTAACATTCAATCTAACATGTGTGGAAATATTTCAGCATTCACTGATTTACTT
 10 LeuThrPheIleSerLysHisValTrpLysTyrLeuPheGlnHisSerSerAspLeuLeu

1090 1110 1130
 AAATCTCAAGATAAGTATTATGAGTATATGATATGTGATAAAAATTTTATTAAATAAA
 LysSerGlnAspSerIleTyrGluTyrMetIleCysAspLysAsnIleLeuLeuAsnLys

15

1150 1170 1190
 TTTATAAAATGTACCAAAAGATTATGGAAATATAAATTGTGCTGCCCTTGCAAGCAGGTATT
 PheIleAsnValProLysAspTyrGlyAsnIleAsnCysAlaAlaPheAlaAlaGlyIle

20

1210 1230
 GTTGAAGGCTCCTCTGTAGTTCTGAATTG
 ValGluGlyPheLeuCysSerSerGluPhe

25

30

35

40

45

50

55

TABELLE 17:

Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des
 5 3' Endes des P.falciparum (Isolat FCBR) Genes, das durch das
 Insert des Klonen 41-2 spezifiziert wird.

	1240	1260	1280
10	GAATTCCAAGCAGATGTTACAGCGCACACTATTCA	GAAGGCAGTATAATTATAACACT	
	GluPheGlnAlaAspValThrAlaHisThrIleHisGluGlyAspAspAsnTyrAsnThr		
15	1300	1320	1340
	ACTATTTTATTAAATTTATCCGGAAAGTAGTGGAAAGAGAAAAAAACACTAGATATT	C	
	ThrIlePheIleLysPheTyrProGluValValGluArgGluLysAsnHis		
20	1360	1380	1400
	ATATAAGGGTCACACAATAAATATACTATATAACATGTTGTATAAGTTGTCAAAAAAA		
25	1420	1440	1460
	TTTATATGGAAAAAAATAATTAAATATGTAAATATATATATATATATATATATAT		
30	1480	1500	1520
	TCTTCTTCTTCTTTTTTTTTGTATTATTAATGTATTATTTATCCTTATG		
35	1540	1560	1580
	CATGGGATTATTTAACAAATTATTGATAAAATAATGTACCCCTTTTTCTTT		
40	1600	1620	1640
	TTTTTCCTTTTTTTTTGTATAAACATATTATATATATTTATTTAACCT		
45	1660	1680	1700
	TTTTAACATTTAAATCTATATGAAATAATAATGAAGACATGACTATTTAAACAG		
50	1720	1740	1760
	GAAATTAAATGGTCCTTAAATTTCACATAAAAAAAAAAAACATATAATATATAT		
55	1780	1800	1820
	ATATATATATAAAACACTTGGTTCAATTTTTTTTTTTTTTTTAA		
60	1840	1860	1880
	TTTGATGGAGATATTATAATTTAACATATATGACATATAGAGGACATACTG		
65	1900	1920	1940
	TTACCAATATTCATACATTGTTGAATTTTTATTTTCAATATCATACATAAGA		
70	1960	1980	2000
	CCTTCTGGAAAAGAAAAAGTAATAAAAGTGTCTATATACTATTAAATTGAATATAGAT		
75	2020	2040	2060
	TTTTTTCTTTCTTCAAAATTAAAAAGTATTCTATCAATGTATGAAATATATAATT		
80	2080	2100	2120
	TTACTTTTTTTGTTCTTTCTATTAAATACGTATGTCCTCGTTTTTTTT		
85	2140	2160	2180
	CTTTTTATAACATTATTGCAATTCCAAATTTTCTATGTGTCCAAAAAA		
90	2200	2220	2240
	AAAAAAATAAAAGTGTAAATAAAAAAATTAAATAATATGTGAAGATACTTTTTAATA		
95	2260		
	TGCATATGTATATATTTATATAGATC		

TABELLE 18:

Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des
41 kD Proteins von P.falciparum.

5

	10	30	50
	AATTTTTTTTGAATATTCTTTTAGCATTGATATAATATTATTTGAAAATGGTAAG		
10	70	90	110
	AATATAAAACATTTAAGAAATAAAATAAAAGTACAGTGTATATACCGTATAATGAA		
	130	150	170
	TAAGTGTATATATATATATATATTAAATACATTATATTATTAATTACCAATGCA		
15	190	210	230
	TAGTTATATATATATACTATTATATGTATTCACTTATTCTGCTCACATTATTAT		
20	250	270	290
	GCATATGCTTCCTTATAATAATAATTCGTATTAACATTCAAGAAAATGAGGACGAAAT		
	310	330	350
	ATTCCTTAATTACATATGTATTTTTATTAAATTGAAAAAAGAAAAAATAGTAAAAA		
25	370	390	410
	TAAGTATAGGCATATATTGAATAATGTGCTGTTGAATTGATTATATATATATATA		
	430	450	470
	TATATGTATATTTATTTATACATATGGAAATTATATATTTCTTCTTCTT		
30	490	510	530
	ATTTTTATATTTATTTTTAGGCTATTGCACTGATATATGAATGCCCAAAA MetAsnAlaProLys		
35	550	570	590
	AAATTACCGCAGATGTTGCCGAAAGATTAGCAACCACCGCCAAAAGCTTGTCAAGCT LysLeuProAlaAspValAlaGluGluLeuAlaThrThrAlaGlnLysLeuValGlnAla		
	610	630	650
	GGAAAGGGAATTAGCTGCTGATGAATCACACAAACCATTAAAGAAAAGATTGACAAC GlyLysGlyIleLeuAlaAlaAspGluSerThrGlnThrIleLysLysArgPheAspAsn		
40	670	690	710
	ATCAAATAGAGAACACAATAGAAAAACAGAGCTAGCTACAGAGATTATTATTTGAACT IleLysLeuGluAsnThrIleGluAsnArgAlaSerTyrArgAspLeuPheGlyThr		
45	730	750	770
	AAAGGATTAGGAAAATTCAATTTCAGGAGCAATTATTGAAAGAAACATTATTCAAAAG LysGlyLeuGlyLysPheIleSerGlyAlaIleLeuPheGluGluThrLeuPheGlnLys		
50	790	810.	830
	AATGAAGCCGGTGTACCAATGGTTAATTATTACACAATGAAAATATAATTCCAGGTATT AsnGluAlaGlyValProMetValAsnLeuLeuHisAsnGluAsnIleIleProGlyIle		
	850	870	890
	AAGGTTGATAAAGGTTGGTTAACATTCCATGCACAGATGAAGAAAATCAACTCAAGGT LysValAspLysGlyLeuValAsnIleProCysThrAspGluGluLysSerThrGlnGly		
55	910	930	950
	TTAGATGGATTAGCAGAAAGATGCAAAGAGTATTATAAGCTGGTGCAAGGTTGCTAAA		

TABELLE 18:

5 LeuAspGlyLeuAlaGluArgCysLysGluTyrTyrLysAlaGlyAlaArgPheAlaLys
 970 990 1010
 TGGAGAACAGTTTAGTTATTGACACAGCCAAAGGAAAACCAACTGATTTATCAATTCAC
 TrpArgThrValLeuValIleAspThrAlaLysGlyLysProThrAspLeuSerIleHis
 10 1030 1050 1070
 GAAACTGCATGGGGATTGGCTAGATATGCATCTATTGTCAACAAAATAGATTAGTTCCA
 GluThrAlaTrpGlyLeuAlaArgTyrAlaSerIleCysGlnGlnAsnArgLeuValPro
 11 1090 1110 1130
 ATTGTTAACCTGAAATTTAGCTGATGGACCACACTCAATTGAAGTTGTGCAGTTGTA
 IleValGluProGluIleLeuAlaAspGlyProHisSerIleGluValCysAlaValVal
 12 1150 1170 1190
 ACTCAAAAAGTTTATCATGTGTATTAAAGCTTACAAGAAAATGGTGTATTATTAGAA
 ThrGlnLysValLeuSerCysValPheLysAlaLeuGlnGluAsnGlyValLeuLeuGlu
 13 1210 1230 1250
 GGTGCATTGTTAAAACCAAACATGGTTACTGCTGGTTATGAATGTACTGCTAAAACACT
 GlyAlaLeuLeuLysProAsnMetValThrAlaGlyTyrGluCysThrAlaLysThrThr
 14 1270 1290 1310
 ACTCAAGATGTTGGTTCTTAACTGTCAGAACCTTAAGGAGAACTGTACCGACCAGCCTTA
 ThrGlnAspValGlyPheLeuThrValArgThrLeuArgArgThrValProProAlaLeu
 15 1330 1350 1370
 CCAGGTGTTGTAATTTATCTGGAGGACAATCAGAAGAAGAGGCCCTCTGTTAATTAAAT
 ProGlyValValPheLeuSerGlyGlyGlnSerGluGluAlaSerValAsnLeuAsn
 16 1390 1410 1430
 TCAATCAATGCTTGGTCCACACCCATGGCTTAACTTCTCTACGGTAGAGCTTTA
 SerIleAsnAlaLeuGlyProHisProTrpAlaLeuThrPheSerTyrGlyArgAlaLeu
 17 1450 1470 1490
 CAAGCTTCAGTATTGAAACACATGGCAAGGAAAGAAAATGTTGCAAAGGCAAGAGAA
 GlnAlaSerValLeuAsnThrTrpGlnGlyLysGluAsnValAlaLysAlaArgGlu
 18 1510 1530 1550
 GTTTTATTACAAAGAGCTGAAGCCAACCTCCTTAGCAACTTATGGTAAATACAAAGGAGGT
 ValLeuLeuGlnArgAlaGluAlaAsnSerLeuAlaThrTyrGlyLysTyrGlyGly
 19 1570 1590 1610
 GCAGGTGGTGAAATGCAGGTGCTTCATTATATGAAAAGAAAATATGTCTATTAAAAACTT
 AlaGlyGlyGluAsnAlaGlyAlaSerLeuTyrGluLysLysTyrValTyr
 20 1630 1650 1670
 CACCAACCAAAATGAATAATAATAATAATAATTACTAAATGAATGGTACTATAT
 21 1690 1710 1730
 TTTTAAAAATAAGGGTAATATATTCTGTATGTATATATATATATATACAAATA
 22 1750 1770 1790
 TGTGAATATAAAAAAAAAAAATGTAATATATCGATCAATGTATATCTACGATAT
 23 1810 1830 1850

TABELLE 18:

5

ATAAATATATATTATTCATATCTCCCTTTTAGATGATATATTATAATACCTAAAATT

10

1870 1890 1910
ATATATATTTTATTATTATTATTATTAAATAATTTTTTATTAGTAAATGAT

15

1930 1950 1970
AATAAATTTTAAACGTTTCAACGTTTATTAAATGTGAAATATAATATAATA

16

1990 2010 2030
TTATATATATATATATATATGTATGTATTATTATTATTTATATACATACAT

20

2050 2070 2090
ACCTGTTGACATTCAATGTAATATAATAAGAACACATGCTTATTTGTATTATATCT

21

2110 2130 2150
TACCTTCTACTTTTAATAAAAAATGTCAAAGCAGGAAATAAAACTTTTAATTAAACC

25

2170 2190 2210
AAAAAAATATAATTAATGATGTACACTATAGATATTGATACAAGAAAAACATTATATAT

30

2230 2250 2270
GTTTTTTTTCTTCTTTTTTTTTTTTTAATTATAACAAAAATATTTATTAA2290 2310 2330
TAATATATAATTAAATGAATGATGCAAATTAAATGAGCCATTATTTATTTAAA

35

2350 2370
TAATTATAATAACGTACATATAAAATGGTGATTGAATT**Ansprüche**

- 40 1. Proteine von *Plasmodium falciparum* mit Aminosäuresequenzen nach Tabelle 1 bis Tabelle 18 und antigenwirksame Teilsequenzen davon.
2. Proteine nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch Expression der Sequenzen der Klone 41-1, 41-2, 41-3, 41-4, 41-5, 41-6, 41-7, 41-8, 41-9, 41-10, 41-12, 41-13, 41-14, 41-15, 41-17, 41-2gen und 41-7gen.
3. Fusionsproteine, die Proteine nach Anspruch 1 enthalten.
4. DNA und RNA, codierend für Proteine nach Anspruch 1.
5. Gereinigte und isolierte DNA Sequenzen nach Tabelle 1 bis Tabelle 18, codierend für Proteine nach Anspruch 1, sowie dazu komplementäre hybridisierende Sequenzen.
6. Vektoren und DNA-Strukturen, die für Proteine nach Anspruch 1 oder 2 oder Fusionsproteine nach Anspruch 3 codieren.
7. Vektoren oder DNA-Strukturen, die DNA-Sequenzen nach Anspruch 5 enthalten.
8. Wirtszellen, enthaltend DNA nach Anspruch 4 oder 5 oder einen Vektor nach Anspruch 6 oder 7.
9. Proteine, exprimiert von einer Wirtszelle nach Anspruch 8.
10. Verfahren zur Herstellung von Proteinen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die für die Proteine nach Tabelle 1 bis Tabelle 18 kodierenden DNA-Sequenzen in pro- oder eukaryotischen Wirtssystemen exprimiert werden.
11. Polyklonale oder monoklonale Antikörper gegen Proteine nach Anspruch 1, 2 oder 3.
12. Vaccine, enthaltend eines oder mehrere der Antigene nach Anspruch 1, 2 oder 3.

13. Vaccine, enthaltend Proteine oder Teile davon, die durch Expression der Klone 41-1, 41-2, und 41-3 erhalten werden.
14. Mittel zur Immunprophylaxe, enthaltend Antikörper nach Anspruch 11.
15. Diagnostika, enthaltend DNA oder RNA nach Anspruch 4, 5, 6 oder 7.
- 5 16. Diagnostika, enthaltend Antikörper nach Anspruch 11.
17. Diagnostika, enthaltend Proteine nach Anspruch 1, 2 oder 3.
18. Proteine, isoliert mit Hilfe von Antikörpern nach Anspruch 11.

10 Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten: GR ES

1. Verfahren zur Herstellung von Plasmodium falciparum Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß die für die Aminosäuresequenzen oder antigen wirkenden Teile davon nach Tabelle 1 bis Tabelle 18 kodierenden DNA-Sequenzen in pro- oder eukaryotischen Wirtssystemen exprimiert werden.
- 75 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenzen der Klone 41-1, 41-2, 41-3, 41-4, 41-5, 41-6, 41-7, 41-8, 41-9, 41-10, 41-12, 41-13, 41-14, 41-15, 41-17, 41-2 gen und 41-7 gen eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß durch Anligieren an Sequenzen der Klone nach Anspruch 2 von anderen Proteinen oder Teilen davon Fusionsproteine hergestellt werden.
- 20 4. Verfahren zur Herstellung von poly- oder monoklonalen Antikörpern, dadurch gekennzeichnet, daß die nach Anspruch 1 oder 2 hergestellten Plasmodium falciparum Proteine zur Immunisierung eingesetzt werden.
5. Verfahren zur Herstellung einer Vaccine, dadurch gekennzeichnet, daß eines oder mehrere der nach Anspruch 1 oder 2 hergestellten Antigene eingesetzt werden.
- 25 6. Verfahren zur Isolierung von Plasmodium falciparum Proteinen, dadurch gekennzeichnet, daß die nach Anspruch 4 hergestellten Antikörper eingesetzt werden.
7. Verfahren zur Herstellung von Diagnostika, dadurch gekennzeichnet, daß nach Anspruch 4 hergestellte Antikörper eingesetzt werden.
- 30 8. Verfahren zur Herstellung von Diagnostika, dadurch gekennzeichnet, daß nach Anspruch 1 oder 2 erzeugte Plasmodium falciparum Proteine eingesetzt werden.
9. Verfahren zur Herstellung von Diagnostika, dadurch gekennzeichnet, daß die für Aminosäuresequenzen von Tabelle 1 bis Tabelle 18 kodierenden Nukleinsäuren eingesetzt werden.

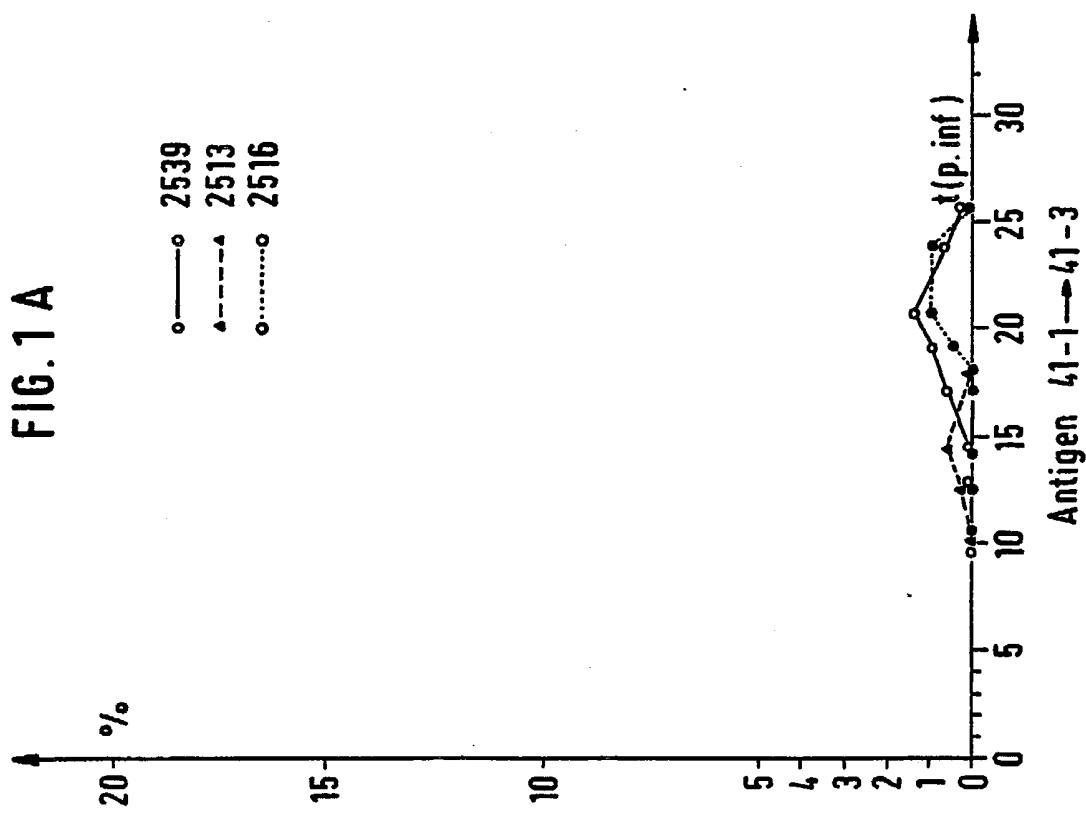
35

40

45

50

55

FIG. 1 A**FIG. 1 B**